

09/831846

PCT/JP99/06449



18.11.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年11月20日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第331727号

出願人  
Applicant(s):

株式会社中外分子医学研究所  
財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦

出証番号 出証特平11-3089649

【書類名】 特許願  
【整理番号】 C2-010  
【提出日】 平成10年11月20日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/12  
【発明の名称】 脳特異的膜蛋白質をコードする新規遺伝子  
【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 舟橋 真一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 宮田 昌二

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2-3 財団法人かずさディ  
ー・エヌ・エー研究所内

【氏名】 野村 信夫

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2-3 財団法人かずさディ  
ー・エヌ・エー研究所内

【氏名】 長瀬 隆弘

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2-3 財団法人かずさディ  
ー・エヌ・エー研究所内

【氏名】 小原 収

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代表者】 大杉 義征

【特許出願人】

【識別番号】 596175810

【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代表者】 平岩 外四

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脳特異的膜蛋白質をコードする新規遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 2】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質と他のペプチドまたはポリペプチドとからなる融合蛋白質。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の DNA が挿入されたベクター。

【請求項 6】 請求項 4 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項 8】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b) 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の抗体と、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出または測定することを含んでなる、該蛋白質の検出

または測定方法。

【請求項 11】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、脳特異的に発現する新規な膜蛋白質、該蛋白質をコードする核酸分子、並びにそれらの製造および用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

神経系では多様な細胞が存在し、これら細胞が神経ネットワークを形成し、高次脳機能を支えている。神経系の分化、発生、アポトーシスのメカニズムの解明は、神経系の機能あるいは神経関連疾患の発症機序の理解を助ける重要な研究課題であり、この分野においては精力的な研究が行なわれている。

【0003】

最近、シナプス後膜の後膜肥厚（ポストシナプスデンシティー：PSD）において、受容体やイオンチャンネル分子が PSD95/SAP90 などの PDZ 蛋白質と複合体を形成し、シグナル伝達を行っていることが報告されるなど（*Science* 269, 1737-1740 (1995), *Nature* 378, 85-88 (1995), *Neuron* 17, 103-113 (1996), *Neuron* 17, 255-265 (1996), *J. Neurosci.* 16, 2157-2163 (1996), *Nature* 386, 223, 239 (1997), *TIBS* 21, 455-458 (1996)、J. Yanagisawa et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 7167-7172)、PDZ 蛋白質をはじめとした新規なシグナル伝達分子が次々と発見されている。

【0004】

PDZ 蛋白質は細胞外からのシグナルを細胞内に伝達するための蛋白質複合体をコンパクトに形成させるためのモジュラー蛋白質としての役割を担っていると考えられており、神経系の複雑なシグナル伝達に重要な働きをしている。

【0005】

一方、細胞膜上に存在する糖蛋白質は、このようなシグナルを受容するリセプ

ターとしての機能していることが予想されており、脳における情報伝達の解明に向けて、このような膜蛋白質の単離、解析が望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、脳特異的に発現する新規な膜蛋白質、該蛋白質をコードする核酸分子、並びにそれらの製造方法および用途を提供する。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒト成人脳で発現している mRNA から 4kb 以上のサイズを有する cDNA のライブラリーを構築し、ショットガン法により該ライブラリーに含まれる cDNA の構造の解析を行った結果、「hh00149」と命名された新規な遺伝子を単離することに成功した。

【0008】

該遺伝子がコードする蛋白質は、20 アミノ酸からなるシグナル配列および細胞膜を貫通する領域であると考えられる疎水性アミノ酸領域を有し、また、6 個のアスパラギン連結型の糖鎖付加部位を有することが推測され、膜貫通型の糖蛋白質であると考えられた。

【0009】

ノーザンブロット解析の結果、hh00149 遺伝子は脳特異的な発現を示した。また、hh00149 蛋白質は、そのカルボキシ末端に「セリンスレオニン-バリン」からなる典型的な PDZ 蛋白質の結合モチーフを有しており、その結合蛋白質として PDZ 蛋白質の存在が示唆された。PDZ 蛋白質に結合する蛋白質にはこれまでにイオンチャンネル、グルタミン酸レセプター、癌化関連遺伝子、細胞接着分子、膜結合のグアニレートキナーゼ、分化制御蛋白質など種々の蛋白質が知られており (Kornau, H.-C., et al. (1995) *Science* 269, 1737-1740, Kim, E. et al. (1995) *Nature* 378, 85-88, Matsumine et al. (1996) *Science* 272, 1020-1023, Axelrod, J.D., et al. (1996) *Science* 271, 1826-1832, J. Yanagisawa et al. *J. Biol. Chem.* 272, 7167-7172 (1997), H. Dong et al. (1997) *Nature* 386, 279-284)、これら蛋白質は種々のシグナル伝達経路に関与している。

【0010】

このような遺伝子発現の組織特異性やその構造上の特徴から、hh00149蛋白質が神経細胞における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として機能することが示唆された。

【0011】

本発明は、脳特異的に発現する新規な膜蛋白質、該蛋白質をコードする核酸分子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(2) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質、

(3) (1) または (2) に記載の蛋白質と他のペプチドまたはポリペプチドとからなる融合蛋白質、

(4) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質をコードするDNA、

(5) (4) に記載のDNAが挿入されたベクター、

(6) (4) に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、

(7) (6) に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) から (3) のいずれか1項に記載の蛋白質の製造方法、

(8) (1) から (3) のいずれかに記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (1) から (3) のいずれか1項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b) (1) から (3) のいずれか1項に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

(9) (1) から (3) のいずれか1項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体、

(10) (9)に記載の抗体と、(1)から(3)のいずれか1項に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出または測定することを含んでなる、該蛋白質の検出または測定方法、

(11) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明は、脳特異的に発現する新規な膜蛋白質「hh00149」に関する。本発明者らにより単離されたhh00149 cDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAがコードするhh00149蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

【0013】

本発明のhh00149蛋白質はアミノ末端の20アミノ酸にシグナル配列と考えられる疎水性アミノ酸の連なった領域が存在し、またC末端側約3分の2の位置に膜貫通領域と予想される疎水性領域が存在しており（実施例6、図3）、細胞膜上に膜貫通型の蛋白質として存在していると考えられる。また、hh00149遺伝子の転写産物は、脳特異的に検出された（実施例5、図2）。これら事実から、hh00149蛋白質が、特に脳における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として機能していることが示唆される。従って、hh00149蛋白質は、神経ペプチドを含む新規なシグナル伝達物質のスクリーニングに利用することができ、神経関連疾患の治療薬や診断薬の開発への利用が期待される。

【0014】

本発明はまた、上記hh00149蛋白質と機能的に同等な蛋白質を包含する。本発明において「機能的に同等」とは、蛋白質が、hh00149蛋白質と同等の生物学的活性を有することを指す。2-ハイブリッドシステムを利用した結合タンパク質の解析から、hh00149蛋白質が「149Y2H#151」蛋白質と結合することが示されている（特願平10-331701号）。従って、該生物学的活性としては、「149Y2H#151」蛋白質との結合活性が挙げられる。また、hh00149蛋白質にはPDZ蛋白質との結合配列が見出され、hh00149蛋白質に結合するPDZ蛋白質の存在が示唆された。従っ



て、該生物学的活性としては、また、PDZ蛋白質との結合活性も考えられる。蛋白質間の結合活性は、例えば、後述する免疫沈降法や酵母の 2-ハイブリッドシステムなどの解析手段を利用して検出することができる。

## 【0015】

hh00149蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得るための方法としては、蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入する方法を用いることができる。例えば、合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法により、蛋白質中のアミノ酸配列に所望の変異を導入することができる (Kramer, W. and Fritz, H. J. *Methods in Enzymol.* (1987) 154, 350-367)。また、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL製) を使用して、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入することもできる。これらの方法により、hh00149蛋白質 (配列番号: 2) において、その生物学的活性に影響を与えないよう、1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾された、hh00149蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることができる。また、タンパク質中のアミノ酸の変異は、自然界においても生じることがある。本発明には、このように人工的または自然にアミノ酸が変異した蛋白質も含まれる。

## 【0016】

hh00149蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が欠失したものの、配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列に 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が付加したものの、配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

## 【0017】

あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc

. Natl. Acad. Sci. USA (1984)81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

【0018】

hh00149蛋白質に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、シグナルペプチドが除去された形態のhh00149蛋白質が挙げられる。また、hh00149蛋白質に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、hh00149蛋白質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、hh00149蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に包含される。融合蛋白質を作製する方法は、hh00149蛋白質をコードするDNAと他のペプチド又は蛋白質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

【0019】

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。また蛋白質としては、例えばGST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。

【0020】

本発明の蛋白質はまた、配列番号: 1に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされており、かつhh00149蛋白質と機能的に同等な蛋白質を含む。ストリンジェントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジェン

トな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2XSSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、2XSSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。

## 【0021】

また、本発明にはhh00149蛋白質と機能的に同等であり、且つ該蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：2）と相同性を有する蛋白質も含まれる。相同性を有する蛋白質とは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%以上、アミノ酸配列上の相同性を有する蛋白質を意味する。蛋白質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

## 【0022】

本発明の蛋白質を製造するには、得られたDNAを発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、蛋白質を発現させる。

## 【0023】

具体的には次のようにすればよい。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、本発明の蛋白質をコードするDNA、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターを構築する。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

## 【0024】

また、その他に蛋白質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（

SV 40 ) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーシオンファクター-1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

【0025】

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0026】

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

【0027】

蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J.Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

【0028】

複製開始点としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0029】

本発明の蛋白質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される

発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えば pEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えば、pBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えば pMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えば pHSV、pMV、pAdexLcw、レトロウイルス由来の発現ベクター。例えば pZIpneo、酵母由来の発現ベクター、例えば pNV11、SP-Q01、枯草菌由来の発現ベクター、例えば pPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えば pQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2 が挙げられる。

【0030】

上述のように構築された本発明の発現ベクターの宿主への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology(1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) 等が用いられる。

【0031】

本発明において、蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。*in vitro* の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0032】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

【0033】

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば サッカロミセス・セレビシエ (

*Saccharomyces cerevisiae* )、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus* ) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger* ) が知られている。

【0034】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli* )、枯草菌が知られている。

【0035】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0036】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

【0037】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0038】

例えば、目的とするDNAをやぎβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をやぎの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から蛋白質を得る。トランスジェニックヤギから産

生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0039】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の蛋白質を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

【0040】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0041】

これにより得られた本発明の蛋白質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を分離、精製することができる。

【0042】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and

Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

【0043】

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

【0044】

本発明はまた、hh00149蛋白質（配列番号：2）の部分ペプチドを含む。部分ペプチドとしては、例えば、hh00149遺伝子がコードする部分ペプチド配列のうち、他の蛋白質、例えば、149Y2H#151蛋白質やPDZ蛋白質との結合部位に相当するペプチドが挙げられる。このような部分ペプチドは、hh00149蛋白質を介したシグナル伝達の阻害などに利用し得る。

【0045】

本発明の蛋白質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

【0046】

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、上述したような本発明の蛋白質の生産に利用される他、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患の遺伝子治療などへ応用することも考えられる。

【0047】

本発明の蛋白質をコードするcDNAは、例えば、本明細書に記載のプロープを用いヒトcDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができる。



【0048】

得られた cDNA 又は cDNA 断片をプローブとして、さらに cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより異なる細胞、組織、臓器又は種から cDNA を得ることができる。cDNA ライブラリーは、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の方法により調製してもよいし、市販の DNA ライブラリーを用いてもよい。

【0049】

また、得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られた cDNA をプローブとしてジェノミック DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ジェノミック DNA を単離することができる。

【0050】

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器から、mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全 RNA から mRNA を精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

【0051】

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) 等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) にしたがって、cDNA の合成および増幅を行うことができる。

【0052】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認すればよい。

【0053】

また、本発明のDNAは、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる(Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, p43-p74)。また、本発明のDNAを市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン(ATG)及び／又は終始コドン(TAA、TGA又はTAG)の挿入等が挙げられる。

【0054】

本発明のDNAは、具体的には、配列番号：2記載のアミノ酸配列からなる蛋白質や上記したその変異体をコードするDNAを包含する。好ましくは、配列番号：1の塩基配列において466位の塩基Aから2832位の塩基Cからなる塩基配列を含むDNAである。

【0055】

本発明のDNAはまた、配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを含む。

【0056】

ストリンジентな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば、低ストリンジентな条件が挙げられる。低ストリンジентの条件とは、例えば42℃、2xSSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2xSSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジентな条件が挙げられる。高ストリンジентな条件とは、例えば65℃、2xSSC及び0.1%SDSが挙げられ

る。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは好ましくは、cDNAまたは染色体DNAである。

## 【0057】

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

## 【0058】

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、精製した蛋白質やその部分ペプチドであっても、細胞表面に発現させた形態、膜画分としての形態であってもよい。

## 【0059】

また、本発明のスクリーニング方法で使用される被験試料としては、例えばペプチド、精製若しくは粗精製蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液、海洋生物抽出液、植物抽出液が挙げられる。被検試料は、天然由来であっても、人工的に合成されたものであってもよい。

## 【0060】

本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明の蛋白質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pCDNA I, pCD8 などの外来遺伝子発現用のプロモーターの下流に挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1  $\alpha$  promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR  $\alpha$  promoter (Takebe et a

1. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987)), リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987)), DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell Biol. 4, 1642-1643 (1985)), リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabin dran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるがいずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位 (エピトープ) を本発明の蛋白質のN 末または C末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合蛋白質として本発明の蛋白質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる (実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質 (GFP) などとの融合蛋白質を発現することができるベクターが市販されている。

【0061】

融合蛋白質にすることにより本発明の蛋白質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合蛋白質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン (His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖蛋白質 (VSV-GP)、T7 gene10 蛋白質 (T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質 (HSV-tag)、E-tag (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明の

蛋白質に結合する蛋白質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。

【0062】

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明の蛋白質、それと結合能を有する蛋白質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明の蛋白質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明の蛋白質に対する抗体は、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させた蛋白質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

【0063】

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明の蛋白質を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合蛋白質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4B などのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明の蛋白質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

【0064】

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献（Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)）記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

【0065】

免疫沈降された蛋白質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることで蛋白質の分子量により結合していた蛋白質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明の蛋白質に結合した蛋白質は、クマシー染色や銀染色といった蛋白質の通常の染色法では検出することは困難であるので

、放射性同位元素である<sup>35</sup>S-メチオニンや<sup>35</sup>S-システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内の蛋白質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。蛋白質の分子量が判明すれば直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的の蛋白質を精製し、その配列を決定することもできる。

【0066】

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を用いて行う方法が挙げられる。

【0067】

本発明の蛋白質とヘテロダイマーからなる転写調節因子の一方のサブユニットとの融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクター及び被験試料として所望のcDNAとヘテロダイマーからなる転写調節因子のもう一方のサブユニットをコードするDNAとを連結してなるDNAを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させ、本発明の蛋白質にcDNAがコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現するような 2-ハイブリッドシステムを用いることができる。または、酵母GAL4蛋白質のようにDNA結合ドメインと転写活性化ドメインを有する転写調節因子の各ドメインを分断して、転写調節因子のDNA結合ドメインと本発明の蛋白質からなる融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクター及び被験試料としての所望のcDNAと転写調節因子転写活性化ドメインをコードするDNAとを連結してなるDNAを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させ、本発明の蛋白質にcDNAがコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現するような 2-ハイブリッドシステムを用いることができる。本発明の蛋白質に結合する蛋白質が存在した場合、レポーター遺伝子の発現量を検出又は測定することにより蛋白質を選択することができる。

【0068】

具体的には、次のようにすればよい。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNAとLexAのDNA結合ドメインをコードする遺伝子とをフレームが一致する

ように連結し、発現ベクターを作製する。次に、所望の cDNA と GAL4 転写活性化ドメインをコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製する。

## 【0069】

LexA 結合モチーフが存在するプロモーターにより転写が調節される HIS3 遺伝子を組み込んだ細胞を上記の 2-ハイブリッドシステム発現プラスミドを用いて形質転換した後、ヒスチジン不含合成培地上でインキュベートすると蛋白質の相互作用が認められたときのみ細胞の生育が観察される。このように、形質転換体の生育程度によりレポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができる。レポーター遺伝子としては、HIS3 遺伝子の他、Ade2 遺伝子、LacZ 遺伝子、CAT 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子等を用いることができる。

## 【0070】

2-ハイブリッドシステムは、通常用いられている方法により構築してもよいし、市販のキットを用いてもよい。市販の 2-ハイブリッドシステムのキットとしては、MATCHMARKER Two-Hybrid System、Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit (いずれも CLONTECH 製)、HybriZAP Two-Hybrid Vector System (Stratagene 製) が挙げられる。

## 【0071】

実際に、酵母の 2-ハイブリッドシステムを用いて APC と hDLG の結合 (A. Matsu mine et al. Science 272, 1020-1023 (1996)); GRIP と AMPA レセプターの結合 (H. Dong et al. Nature 386, 279-284 (1997)); Homer とグルタミン酸レセプター (P. R. Brakeman et al. Nature 386, 284-288 (1997)); SRY と SIP-1 の結合 (F. Poulat et al. J. Biol. Chem. 272, 7167-7172 (1997)) などの PDZ ドメインを有するイオンチャネルやシグナル伝達に関与するレセプター蛋白質の相互作用が証明されている。

## 【0072】

また、本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニングは、ウェストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うこともできる。すなわち、本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現して

いると予想される細胞、組織、臓器より cDNA を単離し、これをファージベクター、例えば  $\lambda$ gt11、ZAPII 等へ導入して cDNA ライブラリーを作製し、これを培地を引いたプレート上で発現させ、フィルターに発現させた蛋白質を固定し、標識して精製した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

## 【0073】

本発明の蛋白質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティクロマトグラフィーを用いて行うこともできる。すなわち、本発明の蛋白質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被験試料を適用する。被験試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合する蛋白質を得ることができる。

## 【0074】

上記のスクリーニング方法によって単離される化合物は、本発明の蛋白質の機能異常などに起因する疾患において、本発明の蛋白質の活性を促進又は阻害するための薬剤の候補となる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

## 【0075】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

## 【0076】

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイク



ロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明の蛋白質と結合活性を有する物質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

## 【0077】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、シヨ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

## 【0078】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HC0-50と併用してもよい。

## 【0079】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0080】

本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

【0081】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0082】

本発明の抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

【0083】

本発明の蛋白質に対して特異的に結合する抗体は、蛋白質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0084】

具体的には、本発明の蛋白質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

【0085】

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

【0086】

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、本明細書に記載された

全ての蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質を使用できる。また、蛋白質の部分ペプチドも用いることができる。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に特異的に反応する抗体を意味する。

【0087】

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、宿主から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得、この蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。

【0088】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

【0089】

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0090】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により

確認する。

【0091】

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

【0092】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

【0093】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0094】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0095】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有

するミエローマ細胞、例えば、U266と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【0096】

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

【0097】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0098】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【0099】

本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Me

thods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照)。

#### 【0100】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

#### 【0101】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR (相補性決定領域) とヒト抗体由来のFR (フレームワーク領域) 及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

#### 【0102】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

#### 【0103】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結

合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC 末端からなる断片あるいはN 末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製) を使用することができる。

【0104】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。

【0105】

本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

【0106】

本発明は、配列番号：1 に示される塩基配列からなるDNA または該DNA と相補的なDNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも15 塩基の鎖長を有するDNA を包含する。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNA 又は該DNA と相補的なDNA と選択的にハイブリダイズし得るプローブ、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等が含まれる。

【0107】

本発明は、例えば、配列番号：1 に示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1 に示される塩基配列中の連続する少なくとも15 個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15 個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0108】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエ

ート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

【0109】

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA 又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA 又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

【0110】

選択的に安定にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAとしては、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなDNAは、後述の実施例に記載するように本発明の蛋白質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

【0111】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA 又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

【0112】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

【0113】

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無



痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

【0114】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L- リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0115】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1 ~100mg/kg、好ましくは0.1 ~50mg/kg の範囲で投与することができる。

【0116】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、したがって本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

【0117】

【実施例】

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0118】

[実施例1] サイズにより分画したヒト脳cDNAライブラリーの構築  
cDNAの構築は、小原らのDNA Research 4, 53-59 (1997)に記載の方法にしたがった。具体的には、2重鎖cDNAはHuman poly A + RNA whole brain (CLONTECH社製カタログ番号 6516-1)を用い、逆転写酵素SuperScript II (GibcoBRL カタログ番号 18064-014)を 5' 端にNot Iサイトを有する(dT)15 プライマー (GACTAGTTCT AGATCGCGAG CGGCCGCCCT TTTTTTTTTT TTTT/配列番号: 3) によりマニュアルに

従いおこなった。得られたcDNAは制限酵素Not Iによる消化につづいてSal I アダプターを連結させた。用いたSal I アダプターを表1に示す。

【0119】

【表1】

---

5'-TCGACCCACGCGTCCG -3'	(配列番号：4)
-------------------------	----------

3'-GGGTGCGCAGGC <sub>p</sub> -5'	(配列番号：5)
----------------------------------	----------

---

【0120】

1%低融点アガロースゲルの電気泳動により3kbよりも短いcDNAを除き、3kbよりもサイズの大きいcDNA断片をNot I、Sal Iによって消化したpBluescript II SK+ (STRATAGENE社製 カタログ番号 212205)と連結反応を行ない、ElectroMax DH10B<sup>TM</sup> cells (GibcoBRL社製 カタログ番号 18290-015)へマニュアルに従いエレクトロポレーションにより導入した。アガープレート上でアンピシリン耐性のコロニーとして得られた独立した8百万のコロニーより標準的なアルカリ/SDSによる溶解法によりプラスミドDNAを抽出した。得られたプラスミドDNAは大部分はclosed circular DNAなので電気泳動によって分離されるサイズは挿入されているcDNAのサイズを反映している。したがって、1%アガロースゲルで10個の分画に分けたものはcDNAのサイズによって分けられたものに相当する。各々の分画は再び大腸菌に導入し、各分画あたり百万以上のコロニーからプラスミドを抽出した。ただし、形質転換した大腸菌は100  $\mu$ g/mlのアンピシリンの入ったLB液体培地で3時間振とう培養した。抽出したプラスミドは電気泳動してそのサイズを確認し、同様の選択方法を挿入されたcDNAのサイズが8kb以下のものについては少なくとも2回、8kb以上のcDNAインサートについては3回のサイズを選択を繰り返し、サイズにより分画したcDNAライブラリーを構築した。

【0121】

【実施例2】 hh00149遺伝子のクローニング

上述の分画されたcDNA ライブラリーよりプラスミドDNAを抽出して塩基配列を決定した。プラスミドDNAはKurabo社のPI-100自動プラスミドDNA抽出装置を使用

して抽出した。ダイープライマーサイクルシーケンシングの反応はABI PRISM<sup>TM</sup> サイクルシーケンシングキット (Perkin-Elmer社製)を使用してCATALYST Turbo (Perkin-Elmer社製)により自動で行なわせた。反応産物はABI373AまたはABI377 DNA シーケンサーにより泳動を行ない、ABI sequence analysis system, INHERITにより解析した。インサートcDNAの両端からのシーケンシングにはDye-labeled M13 forward primer (Perkin-Elmer社製) とreverse primer (Perkin-Elmer社製) を用いた。さらにcDNA全体の塩基配列の決定にはショットガン法を用いた。その1クローンとしてhh00149遺伝子の配列が決定された。hh00149の塩基配列および予想されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: 1 および 2 に示す。

【0122】

[実施例3] 染色体のマッピング

リサーチジェネティクス社 (Research Genetics, Inc.) のGene Bridge 4 Radiation Hybrid Panel を用いてhh00149 遺伝子の染色体上の位置をマッピングした。2 $\mu$ lの10 $\times$ KOD dashバッファー、1.6 $\mu$ lの 2.5mM dNTP、0.8 $\mu$ lの10 $\mu$ M プライマー 149-2867 (CAGGGTGGGA GAAGGGGAAA GAATC/配列番号: 6)、0.8 $\mu$ lの10 $\mu$ M プライマー 149-2944 (GAGGCCATTG ACAGGGAGAC GAAAC/配列番号: 7)、13.4 $\mu$ lの滅菌水、0.4 $\mu$ lのKOD dash DNAポリメラーゼ (TOYOBO #LDP-101) を混合し、94 $^{\circ}$ C 5分の保温の後、98 $^{\circ}$ C 10秒、60 $^{\circ}$ C 2秒、74 $^{\circ}$ C 10秒の3ステップを40回繰り返したpolymerase chain reaction (PCR)を行い、遺伝子の増幅を行った。その結果の解析についてはWorld Wide Web (<http://www.sph.umich.edu/group/stagen/software>)よりダウンロードした解析ソフトを使用した。その結果、染色体6番のマーカーWI-4142から3.2cRにhh00149遺伝子はマップされた。

【0123】

[実施例4] ノーザンブロットによるhh00149遺伝子発現の組織特異性解析

ノーザンブロットは常法に従い、CLONTECH社のMTN Blot (カタログ番号 7760-1, 7766-1, 7756-1, 7757-1, 7755-1, 7769-1)を用いて、25ngのNco I 断片(配列番号: 1 の948から1574に相当)をアマーシャム Megaprime DNA labelling kit (カタログNo. RPN1607)で[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP によりラベルし、プローブとして用いた。ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech社製 カタログNo. 8015-2

) 20mlにて68℃30分間プレハイブリダイゼーションを行い、 $2 \times 10^7$  cpmのラベルされたプローブを同じくExpressHyb Hybridization Solution 20ml ( $1 \times 10^6$  cpm / ml)にて 68℃1時間ハイブリダイズさせた。2×SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム(pH7.0))/0.05% SDS を用いて室温で10分3回フィルターを洗い、さらに 0.1×SSC / 0.1% SDS にて50℃で15分2回洗った後、FUJI Imaging plate (Fuji film社製) にて1晩感光させ、FUJI BAS2000 (Fuji film社製) にて解析した。その結果、脳特異的に3.2kbの転写物が検出され、Human Brain MTN Blot II(カタログ番号 7755-1)、 Human Brain MTN Blot IV (カタログ番号 7769-1)を用いた解析の結果、大脳皮質、後頭葉、前頭葉、側頭葉において高い発現がみられ、小脳、被殻、小脳扁桃においても発現が見られた。また、脳以外では脾臓、精巣、肺がん細胞A549において発現が確認された(図1)。

#### 【0124】

[実施例5] RT-PCRによるhh00149遺伝子発現の組織特異性解析

RT-PCRにより、これまでにノーザンブロットで解析した組織を含む32種類の組織についてのmRNAの発現量の比較を行い、hh00149遺伝子の発現の組織特異性を解析した。cDNAはCLONTECH社より市販されているHuman MTC Panel I(K1402-1)、Human MTC Panel II (K1421-1)、 Human Fetal MTC Panel I (K1425-1)、 Human Tumor MTC Panel(K1422-1)を用いた。2μlの10×KOD dashバッファー、1.6μlの2.5mM dNTP、0.8μlの10μM プライマー 149-2867 (CAGGGTGGGA GAAGGGGAAA GAATC/配列番号: 6)、0.8μlの10μM プライマー 149-2944 (GAGGCCATTG ACA GGGAGAC GAAAC/配列番号: 7)、13.4μlの滅菌水、0.4μlのKOD dash DNAポリメラーゼ(TOYOBO #LDP-101)を混合し、94℃5分の保温の後、98℃10秒、60℃2秒、74℃10秒の3ステップを30回繰り返した。図2にその結果を示す。脳及びに胎児脳においてかなり高い発現が見られた。また、精巣、脾臓、卵巣においても発現がみられたが他の組織においては発現は見られなかった。

#### 【0125】

[実施例6] hh00149蛋白質の構造の予測

GCG Sequence Analysis Software Package (Genetic Computer Group, Oxford Molecular Group, Inc.) の「peptide structure」および「pepplot」を使用し

てhh00149蛋白質の構造を予測した(図3)。その結果、アミノ末端(1-20)および527から557位のアミノ酸が疎水性に富み、前者はシグナル配列として後者は膜貫通領域として機能していることが推測された。

【0126】

【発明の効果】

本発明の膜蛋白質は、脳における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として機能していることが示唆されるため、本発明の膜蛋白質やその遺伝子は神経ペプチドを含む新規なシグナル伝達物質のスクリーニングへの利用が期待される。また、本発明の膜蛋白質やその遺伝子は神経関連疾患の新たな治療薬や診断薬の開発への応用が期待される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

Kazusa DNA Research Institute

<120> Genes encoding brain-specific membrane proteins

<130> C2-010

<160> 7

<210> 1

<211> 3144

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (466)..(2832)

<400> 1

gccctggctcc ctctcgctga gacacacata cactcacaca tacacaaccc ggcaggctcg 60

tctgaacttg aagacacccc acattccaag atgcccaggg ttcctgggaa tgcctggggt 120

tcttcgatcc ggaaaatcct accggcatcc tcttagggag ggattattat tattattttt 180

ctttaatctg gaagagaaga gaacaagttg tgcttttccc cccttcttct tgctaaacgc 240

catggatata actgaataag cggtcaggg ctttccccgc gtggacgtcc gaggccacca 300

tctgcctgca ttgccggag ccgccggagg gtttagctcg agtctgtctc gggcggggaa 360

ggatgcgtgg ccgagccggg gagcccgggc gccccgcgga gccggcctcg gtgccacca 420

gccgggggta gatgctgcct cgcccaggcg ctgagtgacc agacc atg gag acc ctg 477

Met Glu Thr Leu

1

ctt ggt ggc ctg cta gcg ttt ggc atg gcg ttt gcc gtg gtc gac gcc 525

Leu Gly Gly Leu Leu Ala Phe Gly Met Ala Phe Ala Val Val Asp Ala

5

10

15

20

tgc ccc aag tac tgt gtc tgc cag aat ctg tct gag tca ctg ggg acc 573

Cys Pro Lys Tyr Cys Val Cys Gln Asn Leu Ser Glu Ser Leu Gly Thr  
25 30 35

ctg tgc ccc tcc aag ggg ctg ctc ttt gta ccc cct gat att gac cgg 621  
Leu Cys Pro Ser Lys Gly Leu Leu Phe Val Pro Pro Asp Ile Asp Arg  
40 45 50

cgg aca gtg gag ctg cgc ctg ggc ggc aac ttc atc atc cac atc agc 669  
Arg Thr Val Glu Leu Arg Leu Gly Gly Asn Phe Ile Ile His Ile Ser  
55 60 65

cgc cag gac ttt gcc aac atg acg ggg ctg gtg gac ctg acc ctg tcc 717  
Arg Gln Asp Phe Ala Asn Met Thr Gly Leu Val Asp Leu Thr Leu Ser  
70 75 80

agg aac acc atc agc cac atc cag ccc ttt tcc ttt ctg gac ctc gag 765  
Arg Asn Thr Ile Ser His Ile Gln Pro Phe Ser Phe Leu Asp Leu Glu  
85 90 95 100

agc ctc cgc tcc ctg cat ctt gac agc aat cgg ctg cca agc ctt ggg 813  
Ser Leu Arg Ser Leu His Leu Asp Ser Asn Arg Leu Pro Ser Leu Gly  
105 110 115

gag gac acc ctc cgg ggc ctg gtc aac ctg cag cac ctt atc gtg aac 861  
Glu Asp Thr Leu Arg Gly Leu Val Asn Leu Gln His Leu Ile Val Asn  
120 125 130

aac aac cag ctg ggc ggc atc gca gat gag gct ttt gag gac ttc ctg 909  
Asn Asn Gln Leu Gly Gly Ile Ala Asp Glu Ala Phe Glu Asp Phe Leu

135	140	145	
ctg aca ttg gag gat ctg gac ctc tcc tac aac aac ctc cat ggc ctg			957
Leu Thr Leu Glu Asp Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu His Gly Leu			
150	155	160	
ccg tgg gac tcc gtg cga cgc atg gtc aac ctc cac cag ctg agc ctg			1005
Pro Trp Asp Ser Val Arg Arg Met Val Asn Leu His Gln Leu Ser Leu			
165	170	175	180
<hr/>			
gac cac aac ctg ctg gat cac atc gcc gag ggc acc ttt gca gac ctg			1053
Asp His Asn Leu Leu Asp His Ile Ala Glu Gly Thr Phe Ala Asp Leu			
185	190	195	
cag aaa ctg gcc cgc ctg gat ctc acc tcc aat cgg ctg cag aag ctg			1101
Gln Lys Leu Ala Arg Leu Asp Leu Thr Ser Asn Arg Leu Gln Lys Leu			
200	205	210	
ccc cct gat ccc atc ttt gcc cgc tcc cag gct tcg gct ttg aca gcc			1149
Pro Pro Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ser Gln Ala Ser Ala Leu Thr Ala			
215	220	225	
aca ccc ttt gcc cca ccc ttg tcc ttt agt ttt ggg ggt aac cca ctt			1197
Thr Pro Phe Ala Pro Pro Leu Ser Phe Ser Phe Gly Gly Asn Pro Leu			
230	235	240	
cac tgc aat tgt gag ctt ctc tgg ctg cgg agg ctc gag cgg gac gat			1245
His Cys Asn Cys Glu Leu Leu Trp Leu Arg Arg Leu Glu Arg Asp Asp			
245	250	255	260



gac ctg gaa acc tgt ggc tcc cca ggg ggc ctc aag ggt cgc tac ttc 1293

Asp Leu Glu Thr Cys Gly Ser Pro Gly Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Phe

265

270

275

tgg cat gtg cgt gag gag gag ttt gtg tgc gag ccg cct ctc atc acc 1341

Trp His Val Arg Glu Glu Glu Phe Val Cys Glu Pro Pro Leu Ile Thr

280

285

290

cag cac aca cac aag ttg ctg gtt ctg gag ggc cag gcg gcc aca ctc 1389

Gln His Thr His Lys Leu Leu Val Leu Glu Gly Gln Ala Ala Thr Leu

295

300

305

aag tgc aaa gcc att ggg gac ccc agc ccc ctt atc cac tgg gta gcc 1437

Lys Cys Lys Ala Ile Gly Asp Pro Ser Pro Leu Ile His Trp Val Ala

310

315

320

ccc gat gac cgc ctg gta ggg aac tcc tca agg acc gct gtc tat gac 1485

Pro Asp Asp Arg Leu Val Gly Asn Ser Ser Arg Thr Ala Val Tyr Asp

325

330

335

340

aat ggc acc ctg gac atc ttc atc acc aca tct cag gac agt ggt gcc 1533

Asn Gly Thr Leu Asp Ile Phe Ile Thr Thr Ser Gln Asp Ser Gly Ala

345

350

355

ttc acc tgc att gct gcc aat gct gcc gga gag gcc acg gcc atg gtg 1581

Phe Thr Cys Ile Ala Ala Asn Ala Ala Gly Glu Ala Thr Ala Met Val

360

365

370

gag gtc tcc atc gtc cag ctg cca cac ctc agc aac agc acc agc cgc	1629
Glu Val Ser Ile Val Gln Leu Pro His Leu Ser Asn Ser Thr Ser Arg	
375 380 385	
act gca ccc ccc aag tcc cgc ctc tca gac atc act ggc tcc agc aag	1677
Thr Ala Pro Pro Lys Ser Arg Leu Ser Asp Ile Thr Gly Ser Ser Lys	
390 395 400	
acc agc cgg gga ggt gga ggc agt ggg ggc gga gag cct ccc aaa agc	1725
Thr Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Pro Pro Lys Ser	
405 410 415 420	
ccc ccg gaa cgg gct gtg ctt gtg tct gaa gtg acc acc acc tcg gcc	1773
Pro Pro Glu Arg Ala Val Leu Val Ser Glu Val Thr Thr Thr Ser Ala	
425 430 435	
ctg gtc aag tgg tct gtc agc aag tca gca ccc cgg gtg aag atg tac	1821
Leu Val Lys Trp Ser Val Ser Lys Ser Ala Pro Arg Val Lys Met Tyr	
440 445 450	
cag ctg cag tac aac tgc tct gac gat gag gta ctg att tac agg atg	1869
Gln Leu Gln Tyr Asn Cys Ser Asp Asp Glu Val Leu Ile Tyr Arg Met	
455 460 465	
atc cca gcc tcc aac aag gcc ttc gtg gtc aac aac ctg gtg tca ggg	1917
Ile Pro Ala Ser Asn Lys Ala Phe Val Val Asn Asn Leu Val Ser Gly	
470 475 480	
act ggc tac gac ttg tgt gtg ctg gcc atg tgg gat gac aca gcc acg	1965

Thr Gly Tyr Asp Leu Cys Val Leu Ala Met Trp Asp Asp Thr Ala Thr  
485 490 495 500

aca ctc acg gcc acc aac atc gtg ggc tgc gcc cag ttc ttc acc aag 2013  
Thr Leu Thr Ala Thr Asn Ile Val Gly Cys Ala Gln Phe Phe Thr Lys  
505 510 515

gct gac tac ccg cag tgc cag tcc atg cac agc cag att ctg ggc ggc 2061  
Ala Asp Tyr Pro Gln Cys Gln Ser Met His Ser Gln Ile Leu Gly Gly  
520 525 530

acc atg atc ctg gtc atc ggg ggc atc atc gtg gcc acg ctg ctg gtc 2109  
Thr Met Ile Leu Val Ile Gly Gly Ile Ile Val Ala Thr Leu Leu Val  
535 540 545

ttc atc gtc atc ctc atg gtg cgc tac aag gtc tgc aac cac gag gcc 2157  
Phe Ile Val Ile Leu Met Val Arg Tyr Lys Val Cys Asn His Glu Ala  
550 555 560

ccc agc aag atg gca gcg gcc gtg agc aat gtg tac tcg cag acc aac 2205  
Pro Ser Lys Met Ala Ala Ala Val Ser Asn Val Tyr Ser Gln Thr Asn  
565 570 575 580

ggc gcc cag cca ccg cct cca agc agc gca cca gcc ggg gcc ccg ccg 2253  
Gly Ala Gln Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Pro Ala Gly Ala Pro Pro  
585 590 595

cag ggc ccg ccg aag gtg gtg gtg cgc aac gag ctc ctg gac ttc acc 2301  
Gln Gly Pro Pro Lys Val Val Val Arg Asn Glu Leu Leu Asp Phe Thr

600	605	610	
gcc agc ctg gcc cgc gcc agt gac tcc tct tcc tcc agc tcc ctg ggc			2349
Ala Ser Leu Ala Arg Ala Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly			
615	620	625	
agt ggg gag gct gcg ggg ctg gga cgg gcc ccc tgg agg atc cca ccc			2397
Ser Gly Glu Ala Ala Gly Leu Gly Arg Ala Pro Trp Arg Ile Pro Pro			
630	635	640	
tcc gcc ccg cgc ccc aag ccc agc ctt gac cgc ctg atg ggg gcc ttc			2445
Ser Ala Pro Arg Pro Lys Pro Ser Leu Asp Arg Leu Met Gly Ala Phe			
645	650	655	660
gcc tcc ctg gac ctc aag agt cag aga aag gag gag ctg ctg gac tcc			2493
Ala Ser Leu Asp Leu Lys Ser Gln Arg Lys Glu Glu Leu Leu Asp Ser			
665	670	675	
agg act cca gcc ggg aga ggg gct ggg acg tcg gcc cgg ggc cac cac			2541
Arg Thr Pro Ala Gly Arg Gly Ala Gly Thr Ser Ala Arg Gly His His			
680	685	690	
tcg gac cga gag cca ctg ctg ggg ccc cct gcg gcc cgg gcc agg agc			2589
Ser Asp Arg Glu Pro Leu Leu Gly Pro Pro Ala Ala Arg Ala Arg Ser			
695	700	705	
ctg ctc ccc ttg ccg ttg gag ggc aag gcc aaa cgc agc cac tcc ttc			2637
Leu Leu Pro Leu Pro Leu Glu Gly Lys Ala Lys Arg Ser His Ser Phe			
710	715	720	

gac atg ggg gac ttt gct gct gcg gcg gcg gga ggg gtc gtg ccg ggc 2685  
 Asp Met Gly Asp Phe Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Val Pro Gly  
 725 730 735 740

ggc tac agt cct cct cgg aag gtc tcg aac atc tgg acg aag cgc agc 2733  
 Gly Tyr Ser Pro Pro Arg Lys Val Ser Asn Ile Trp Thr Lys Arg Ser  
 745 750 755

ctc tct gtc aac ggc atg ctc ttg ccc ttt gag gag agt gac ctg gtg 2781  
 Leu Ser Val Asn Gly Met Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ser Asp Leu Val  
 760 765 770

ggg gcc cgg ggg act ttt ggc agc tcc gaa tgg gtg atg gag agc acg 2829  
 Gly Ala Arg Gly Thr Phe Gly Ser Ser Glu Trp Val Met Glu Ser Thr  
 775 780 785

gtc taggtggggg tgggcatgct ccctttcctg tgcgcagggt gggagaagg 2882  
 Val

gaaagaatct cactggcaag tgtttgtgga gtttccatgg tgatgtttac atccaggac 2942

agtttcgtct ccctgtcaat ggccctcgtgt cccccctac cccgcaacac ccacatcacc 3002

tccccaccac ccggccgggg tgtgctcagg gaatgtggac tcgctcaaat gccggactga 3062

gccctgagtg tttggaaagg cgagactccg cctttctaata cacaatgta gcctacaagc 3122

aagcggcttt ggattgctta tg

3144

<210> 2

<211> 789

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Thr Leu

1

Leu Gly Gly Leu Leu Ala Phe Gly Met Ala Phe Ala Val Val Asp Ala

5

10

15

20

Cys Pro Lys Tyr Cys Val Cys Gln Asn Leu Ser Glu Ser Leu Gly Thr

25

30

35

Leu Cys Pro Ser Lys Gly Leu Leu Phe Val Pro Pro Asp Ile Asp Arg

40

45

50

Arg Thr Val Glu Leu Arg Leu Gly Gly Asn Phe Ile Ile His Ile Ser

55

60

65

Arg Gln Asp Phe Ala Asn Met Thr Gly Leu Val Asp Leu Thr Leu Ser

70

75

80

Arg Asn Thr Ile Ser His Ile Gln Pro Phe Ser Phe Leu Asp Leu Glu

85

90

95

100

Ser Leu Arg Ser Leu His Leu Asp Ser Asn Arg Leu Pro Ser Leu Gly  
105 110 115

Glu Asp Thr Leu Arg Gly Leu Val Asn Leu Gln His Leu Ile Val Asn  
120 125 130

Asn Asn Gln Leu Gly Gly Ile Ala Asp Glu Ala Phe Glu Asp Phe Leu  
135 140 145

Leu Thr Leu Glu Asp Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu His Gly Leu  
150 155 160

Pro Trp Asp Ser Val Arg Arg Met Val Asn Leu His Gln Leu Ser Leu  
165 170 175 180

Asp His Asn Leu Leu Asp His Ile Ala Glu Gly Thr Phe Ala Asp Leu  
185 190 195

Gln Lys Leu Ala Arg Leu Asp Leu Thr Ser Asn Arg Leu Gln Lys Leu  
200 205 210

Pro Pro Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ser Gln Ala Ser Ala Leu Thr Ala  
215 220 225

Thr Pro Phe Ala Pro Pro Leu Ser Phe Ser Phe Gly Gly Asn Pro Leu  
230 235 240

His Cys Asn Cys Glu Leu Leu Trp Leu Arg Arg Leu Glu Arg Asp Asp

245                      250                      255                      260

Asp Leu Glu Thr Cys Gly Ser Pro Gly Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Phe

265 270 275

Trp His Val Arg Glu Glu Glu Phe Val Cys Glu Pro Pro Leu Ile Thr

280                      285                      290

Gln His Thr His Lys Leu Leu Val Leu Glu Gly Gln Ala Ala Thr Leu

295 300 305

Lys Cys Lys Ala Ile Gly Asp Pro Ser Pro Leu Ile His Trp Val Ala

**310**

Pro Asp Asp Arg Leu Val Gly Asn Ser Ser Arg Thr Ala Val Tyr Asp

325                      330                      335                      340

Asn Gly Thr Leu Asp Ile Phe Ile Thr Thr Ser Gln Asp Ser Gly Ala

**345**

Phe Thr Cys Ile Ala Ala Asn Ala Ala Gly Glu Ala Thr Ala Met Val

**360**

Glu Val Ser Ile Val Gln Leu Pro His Leu Ser Asn Ser Thr Ser Arg

**375**

Thr Ala Pro Pro Lys Ser Arg Leu Ser Asp Ile Thr Gly Ser Ser Lys

**390                      395                      400**



Thr Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Pro Pro Lys Ser  
405 410 415 420

Pro Pro Glu Arg Ala Val Leu Val Ser Glu Val Thr Thr Thr Ser Ala  
425 430 435

Leu Val Lys Trp Ser Val Ser Lys Ser Ala Pro Arg Val Lys Met Tyr  
440 445 450

Gln Leu Gln Tyr Asn Cys Ser Asp Asp Glu Val Leu Ile Tyr Arg Met  
455 460 465

Ile Pro Ala Ser Asn Lys Ala Phe Val Val Asn Asn Leu Val Ser Gly  
470 475 480

Thr Gly Tyr Asp Leu Cys Val Leu Ala Met Trp Asp Asp Thr Ala Thr  
485 490 495 500

Thr Leu Thr Ala Thr Asn Ile Val Gly Cys Ala Gln Phe Phe Thr Lys  
505 510 515

Ala Asp Tyr Pro Gln Cys Gln Ser Met His Ser Gln Ile Leu Gly Gly  
520 525 530

Thr Met Ile Leu Val Ile Gly Gly Ile Ile Val Ala Thr Leu Leu Val  
535 540 545

Phe Ile Val Ile Leu Met Val Arg Tyr Lys Val Cys Asn His Glu Ala  
550 555 560

Pro Ser Lys Met Ala Ala Ala Val Ser Asn Val Tyr Ser Gln Thr Asn  
565 570 575 580

Gly Ala Gln Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Pro Ala Gly Ala Pro Pro  
585 590 595

Gln Gly Pro Pro Lys Val Val Val Arg Asn Glu Leu Leu Asp Phe Thr  
600 605 610

Ala Ser Leu Ala Arg Ala Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly  
615 620 625

Ser Gly Glu Ala Ala Gly Leu Gly Arg Ala Pro Trp Arg Ile Pro Pro  
630 635 640

Ser Ala Pro Arg Pro Lys Pro Ser Leu Asp Arg Leu Met Gly Ala Phe  
645 650 655 660

Ala Ser Leu Asp Leu Lys Ser Gln Arg Lys Glu Glu Leu Leu Asp Ser  
665 670 675

Arg Thr Pro Ala Gly Arg Gly Ala Gly Thr Ser Ala Arg Gly His His  
680 685 690

Ser Asp Arg Glu Pro Leu Leu Gly Pro Pro Ala Ala Arg Ala Arg Ser  
695 700 705

Leu Leu Pro Leu Pro Leu Glu Gly Lys Ala Lys Arg Ser His Ser Phe

710

715

720

Asp Met Gly Asp Phe Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Val Pro Gly

725

730

735

740

Gly Tyr Ser Pro Pro Arg Lys Val Ser Asn Ile Trp Thr Lys Arg Ser

745

750

755

Leu Ser Val Asn Gly Met Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ser Asp Leu Val

760

765

770

Gly Ala Arg Gly Thr Phe Gly Ser Ser Glu Trp Val Met Glu Ser Thr

775

780

785

Val

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 3

gactagtctt agatcgcgag cggccgccct tttttttttt tttt

44

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized adapter sequence.

<400> 4

tcgacccacg cgtccg

16

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized adapter sequence.

<400> 5

cggacgcgtg gg

12

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 6

cagggtggga gaaggggaaa gaatc

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 7

gaggccattg acaggagac gaaac

25

# 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

hh00149遺伝子のノーザンブロット解析の結果を示す写真である。図中の「H」はHuman MTN Blot (CLONTECH社製 カタログ番号 7760-1)を用いて検出したもので、1.心臓、2.脳、3.胎盤、4.肺、5.肝臓、6.骨格筋、7.腎臓、8.すい臓を示す。「H4」はHuman MTN Blot IV (CLONTECH社製 カタログ番号 7766-1)を用いて検出したもので、1.脾臓、2.胸腺、3.前立腺、4.精巣、5.子宮、6.小腸、7.大腸、8.末梢リンパ球を示す。「F」はHuman Fetal MTN Blot II (CLONTECH社製 カタログ番号 7756-1)を用いて検出したもので、1.胎児脳、2.胎児肺、3.胎児肝臓、4.胎児腎臓を示す。「C」はHuman Cancer Cell Line MTN Blot II (CLONTECH社

製 カタログ番号 7757-1)を用いて検出したもので、1.急性白血病HL-60細胞、2. HeLa細胞S3、3.慢性骨髄性白血病K-562、4.リンパ芽球性白血病MOLT-4細胞、5. パーキットリンフォーマRaji細胞、6.大腸腺癌SW-480細胞、7.肺癌A549細胞、8. 黒色腫G361細胞をそれぞれ示す。「B2」はHuman Barin MTN Blot II (CLONTECH 社製 カタログ番号 7755-1) を用いて検出したもので、1.小脳、2.大脳皮質、3. 延髄、4.脊髄、5.後頭葉、6.前頭葉、7.側頭葉、8.被殻をそれぞれ示す。「B4」 はHuman Brain MTN Blot IV (CLONTECH社製 カタログ番号 7769-1) を用いて検 出したもので、1.小脳扁桃、2.尾状核、3.脳梁、4.海馬、5.全脳、6.黒質、7.視 床を示す。

### 【図2】

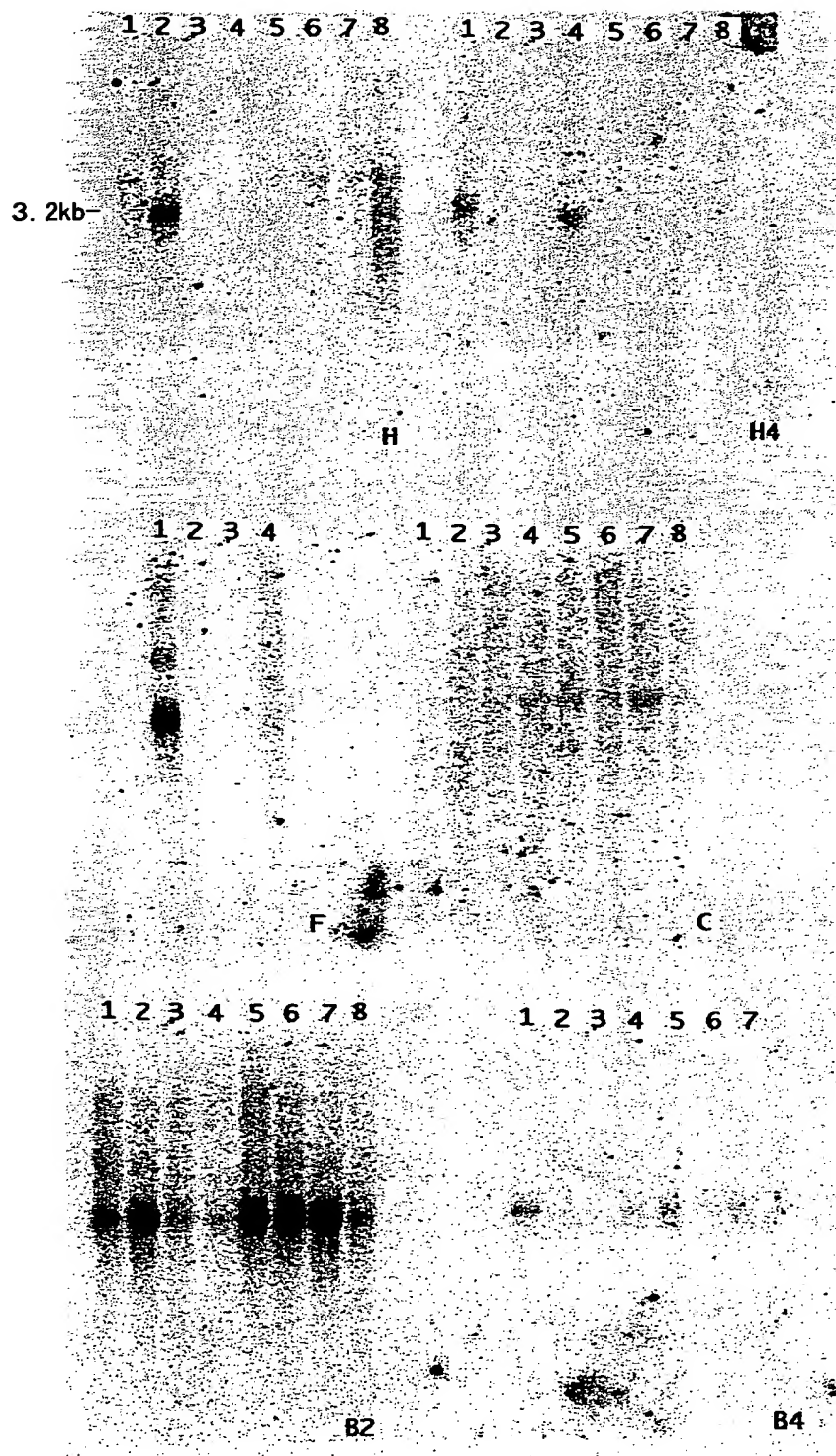
RT-PCR の結果を示す写真である。使用した第1鎖cDNAは1.脳、2.心臓、3.腎 臓、4.肝臓、5.肺、6.すい臓、7.胎盤、8.骨格筋、9.大腸、10.卵巣、11.末梢リ ンパ球、12.前立腺、13.小腸、14.脾臓、15.精巣、16.胸腺、. 17.胎児脳、18.胎 児心臓、19.胎児腎臓、20.胎児肝臓、21. 胎児肺、22.胎児骨格筋、23.胎児脾臓 , 24.胎児胸腺、25Breast carcinoma (GI-101)、26.Lung carcinoma(LX-1)、27. Colon adenocarcinoma (CX-1)、28.Lung carcinoma (GI-117)、29.Prostatic ad enocarcinoma (PC-3)、30.Colon adenocarcinoma (GI-112)、31.Ovarian carcin oma (GI-102)、32.Pancreatic adenocarcinoma (GI-103) (CLONTECH社製 カタロ グ番号 K1420-1, K1421-1, K1425-1, K1422-1)の32種類である。上段はhh00149 遺伝子を、下段はG3PDH遺伝子(対照)を検出するプライマーを用いたRT-PCRの結 果である。

### 【図3】

hh00149蛋白質の構造の予測を示す図である。図中ひし形のマークは疎水性領 域を示し、楕円形のマークは親水性領域を示す。

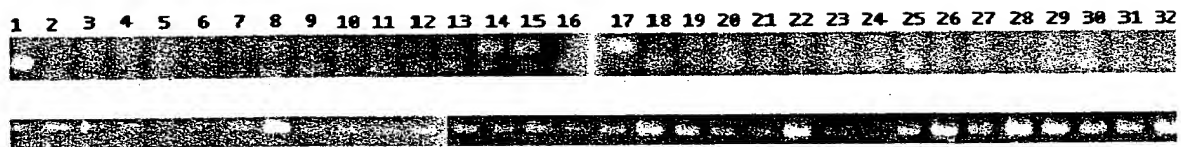
【書類名】 図面

【図1】



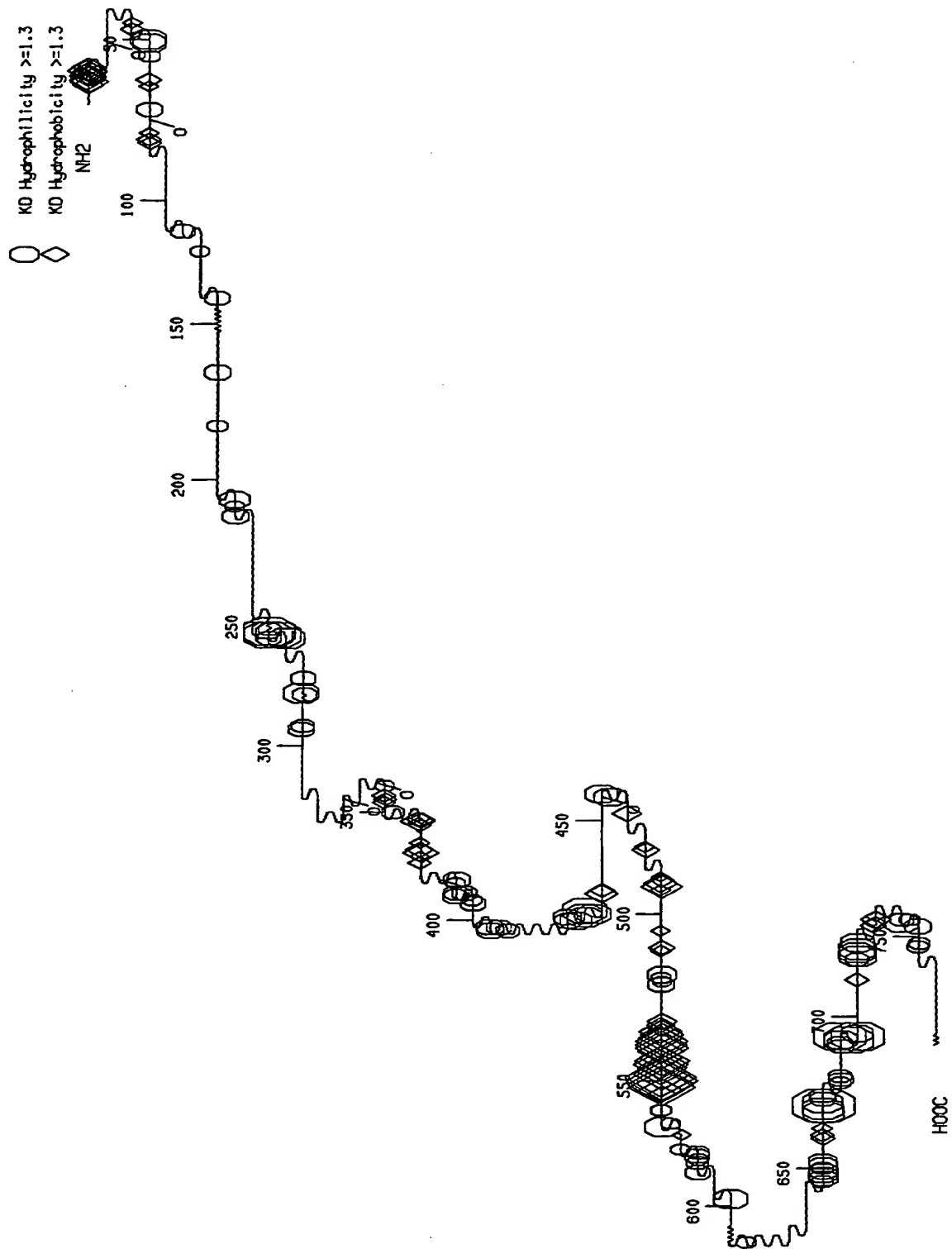
【図2】

特平10-331727



【図3】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脳特異的に発現する新規な膜蛋白質、該蛋白質をコードする核酸分子、並びにそれらの製造方法および用途を提供する。

【解決手段】 ヒト成人脳で発現している mRNA から 4kb 以上のサイズを有する cDNA のライブラリーを構築し、ショットガン法により該ライブラリーに含まれる cDNA の構造の解析を行った結果、膜貫通型の糖蛋白質をコードすると考えられる新規な遺伝子を単離することに成功した。該遺伝子は脳特異的な発現を示し、また、該遺伝子がコードする蛋白質は、典型的な PDZ 蛋白質の結合モチーフを有していた。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596102791  
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地 2  
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 596175810  
【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1532-3  
【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】 100102978  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2  
氏 名 株式会社中外分子医学研究所

---

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596175810]

1. 変更年月日 1996年12月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那1532-3

氏 名 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**